

HOTAIRによる肝細胞癌悪性化機構の制御

著者	藤坂 泰之
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17713号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123759

博士論文

HOTAIR による肝細胞癌悪性化機構の制御

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座 消化器病態学分野

藤坂泰之

目次

I. 要旨	3
II. 略語一覽	5
III. 研究背景	6
IV. 研究目的	8
V. 研究方法	9
VI. 研究結果	17
VII. 考察	22
VIII. 結論	26
IX. 謝辞	26
X. 参考文献	27
XI. 図表説明	33

I. 要旨

[背景] HOTAIR (HOX transcript Antisense Intergenic RNA) は HOX 遺伝子座で同定された転写抑制に関与する lincRNA (large intervening non-coding RNA)であり、その発現が肝臓癌を含む様々な癌の転移や予後不良と関連していることが報告されている。しかし、肝細胞癌における HOTAIR による癌進展促進の詳細な分子機序は未だ十分に解明されていない。近年、腫瘍随伴マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM) や骨髄由来抑制性細胞 (Myeloid-derived suppressor cell, MDSC)といった癌細胞周囲の免疫担当細胞が生体免疫を抑制することで癌の進展に寄与していることが示唆されている。HOTAIR の腫瘍免疫への関与についての報告は現在までみられない。

[目的] 肝細胞癌における HOTAIR の癌悪性化の分子機序を明らかにすることを目的とした。

[方法] 内因性 HOTAIR の発現の低い肝細胞癌細胞株に HOTAIR の cDNA を、発現の高い細胞株には HOTAIR の siRNA を、レトロウイルスを用いて遺伝子導入し、それぞれ強制発現細胞・発現抑制細胞を作製し機能を解析した。肝癌細胞で発現の変動している分子はマイクロアレイを用い網羅的解析を行い同定した。HOTAIR と腫瘍免疫の関連については、健常人の末梢血単核球 (PBMC) と HOTAIR の発現を増強あるいは減少させた肝癌細胞を共培養しフローサイトメーターを用いて解析した。また、ヒト肝細胞癌手術検体と Gene Expression Omnibus から得られたデータベース

(GSE2109) を用いて HOTAIR と chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) の発現と臨床因子との関連を検討した。

[結果] HOTAIR 強制発現および発現抑制肝癌細胞の細胞増殖能、細胞移動能はそれぞれのコントロール細胞と比べ有意な差を示さなかった。網羅的遺伝子解析の結果、コントロール細胞と比べ HOTAIR 発現肝細胞癌において CCL2 が最も発現の亢進した遺伝子として同定された。HOTAIR を強制発現させた肝癌細胞は共培養した PBMC 中のマクロファージ分画と MDSC 分画中の細胞数を有意に増加させた。また、この変化は CCL2 の発現のない肝癌細胞では認められなかった。HOTAIR と CCL2 が共に高発現している例は stage の高い肝癌症例に高頻度存在していた。

[結論] 本研究の結果、HOTAIR による肝癌悪性化の分子機序のひとつとして、CCL2 の発現亢進を介した TAM・MDSC の誘導が示唆された。

II. 略語一覧

CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2

cDNA: complementary DNA

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

EMT: epithelial-mesenchymal transition

FBS: Fetal Bovine Serum

HOTAIR: HOX transcript antisense Intergenic RNA

lincRNA: large intervening non-coding RNA

MDSC: myeloid-derived suppressor cell

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PBS: phosphate buffered saline

PRC2: polycomb repressive complex 2

RP II: RNA polymerase II

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

TAM: tumor-associated macrophage

III. 研究背景

肝細胞癌は世界で 5 番目に多い癌腫であり、肝細胞癌関連死は世界で 2 番目に多いことが報告されている。また、全世界で年間およそ 700,000 人が新規に肝細胞癌と診断され、600,000 人以上が肝細胞癌関連死を迎えている¹⁻³⁾。肝細胞癌は再発することが多く、繰り返し治療が必要となる悪性腫瘍であり、治療に耐性を示す難治例も多い。現在、外科手術・ラジオ波焼灼療法・血管塞栓術・放射線治療・抗癌剤治療など様々な治療法があり、腫瘍の状態や肝予備能などにより選択されているが、十分な治療効果が得られる症例は限られている³⁾。従って、肝細胞癌患者の予後を改善するためには、その悪性化機構を解明し、新たな治療標的を同定していく必要がある。

近年、タンパク質をコードしない ncRNA (non-coding RNA) が遺伝子発現の様々な段階で重要な制御因子として機能していることが明らかとなってきた。ncRNA のうち、数百～数万塩基長の高分子の lincRNA (large intervening non-coding RNA) が多数同定されてきている⁴⁾。HOTAIR は、2158 塩基の lincRNA で、polycomb repressive complex 2 と結合することで HOXD 遺伝子群の転写を抑制し、がんの転移を促進すると言われている⁵⁾。2010 年に HOTAIR が高発現している乳癌症例では転移を示す例が多く予後不良であることが報告された⁵⁾。その後、これまで肝細胞癌を含む多くの癌症例で乳癌と同様に HOTAIR の高発現と予後不良との関連が示されている⁶⁻¹³⁾。HOTAIR による癌進展の機序として、癌細胞の増殖能を亢進させることや上皮間葉形質転換 (EMT) を誘導すること、あるいは Notch シグナルを活性化す

ることによって移動能や浸潤能を促進することなどが示唆されている^{14, 15)}。その一方で、癌腫により、HOTAIR 標的遺伝子に統一性がなく¹⁶⁾、その癌悪性度増強の分子機序に未解明な点が多い¹⁷⁾。

最近の研究から腫瘍免疫が癌の悪性化に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。腫瘍随伴マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM) や骨髄由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cells , MDSC) といった癌細胞周囲の免疫細胞が生体免疫機構を抑制し、癌の進展を助長していることが報告されている¹⁸⁻²¹⁾。TAM は肝細胞癌を含む多くの腫瘍において腫瘍浸潤白血球の主要な構成細胞であり、腫瘍部位における TAM の増加と生命予後短縮の関係が数多く示されている²²⁻²⁴⁾。TAM は CD8⁺T 細胞の機能抑制を介して抗腫瘍免疫を抑制し腫瘍の増大・浸潤・転移に寄与している。また、腫瘍部には TAM と免疫表現型が類似する免疫細胞が複数存在する。その中でも MDSC は、強力な T 細胞機能障害誘導活性を有し、腫瘍の増大や浸潤に寄与していることが知られ、ヒトでは CD33⁺CD14⁺HLA-DR^{low/-}CD11b⁺で表現される²⁵⁻²⁷⁾。しかし、HOTAIR と腫瘍免疫の関連について未だ報告はない。

IV. 研究目的

HOTAIR と肝細胞癌増殖能・移動能との関連や肝細胞癌腫瘍形成能への関与について検討を行う。また、肝細胞癌における HOTAIR 標的因子の同定し、ヒト肝細胞癌組織上の HOTAIR とその標的分子の発現について検討する。さらに、HOTAIR の腫瘍免疫への関与について検討する。

以上の解析に基づき、HOTAIR による肝細胞癌悪性化の機序を同定することを目的とした。

V. 研究方法

1. 使用細胞株

肝癌細胞株 Huh7, HepG2, Li7 は理化学研究所バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) より、Hep3B は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター (Sendai, Japan) より購入した。レトロウィルスパッケージング細胞株 (Platinum-A 細胞) は東京大学医科学研究所北村俊雄教授より供与を受けた²⁸⁾。細胞培養はウシ胎児血清 BSA (bovine serum albumin) である FBS (EuroClone, Milano, Italy) とペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco/Life technologies Co., CA) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、5% CO₂、37°C の加湿環境下で継代培養した。

2. 組み換えプラスミドベクターの作成

HOTAIR (addgene Cambridge, MA) 全長の cDNA を鋳型として両端に EcoRI の制限酵素サイトを持った DNA を PCR 法により増幅した。その PCR 産物を FastDigest®EcoRI (Thermo Fisher Scientific, MA) で処理後、pBabe-hygro-Vector (Clontech Laboratories, Inc, CA) のマルチクローニングサイトにサブクローニングすることで、組み換えベクター (pBabe-hygro-HOTAIR) を作成した。

3. HOTAIR 安定過剰発現株の作成

肝癌細胞株 Li7, Hep3B に上述の pBabe-hygro-HOTAIR を以下の方法で導入した。Opti-MEM I (Gibco/Life technologies Co.) 300 μ l に HOTAIR 発現ベクター 6.5 μ g を加え、さらに FuGENE HD (Roche Applied Science) 26 μ l を添加混合後に 10 分間静置し、全量をレトロウイルスパッケージング細胞株 (Platinum-A 細胞) の培養液に滴下した。37°C の加湿環境下で 48 および 72 時間培養後にウイルス液を回収し、0.45 μ m のフィルターでろ過し、Li7 および Hep3B 細胞株に滴下した。37°C で 24 時間培養後、ハイグロマイシンで選別し、HOTAIR 安定過剰発現株を作成した。

同様に HOTAIR の cDNA を含まない pBabe-hygro-Vector (Empty vector) を Li7 および Hep3B に遺伝子導入し、コントロール細胞株を作成した。作成した細胞株から全 RNA を抽出した後 cDNA 化し、定量的 RT-PCR を行い HOTAIR の発現を確認した。

4. HOTAIR 発現のノックダウン

肝癌細胞株 Huh7 に対して HOTAIR の 3 種類の siRNA (siHOTAIR1, HSSS160170; siHOTAIR2, HSSS160171; siHOTAIR3, HSSS160172) (Invitrogen/Life technologies Co., CA) を以下のように導入した。50 μ l の Opti-MEM I (Gibco/Life technologies Co.) に siHOTAIR (5 pmol) と 0.75 μ l の Lipofectamine RNAi MAX Reagent (Invitrogen/ Life technologies Co.) を混合し 5 分

間静置後、24 ウェルプレートに播いた Huh7 (2.5×10^4 個) の培地 (250 μ l) に加え、37°C で培養した。同様の方法で Negative Control (siControl) として Stealth RNAi siRNA Negative Control Med GC (Invitrogen/Life technologies Co.) をトランスフェクションし、コントロール細胞株を作製した。培養 24 時間後に作製した各々の細胞株から全 RNA を抽出し cDNA 化の後、定量的 RT-PCR で HOTAIR の発現を測定した。siRNA 導入後 24 時間後に HOTAIR の発現が抑制されていることを確認した。以下の実験には siRNA 導入後 24 時間後の細胞を用いた。

5. RNA 抽出・cDNA 作成

細胞株およびヒト肝癌組織からの全 RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いた。RNA 濃度は NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE) で測定した。

cDNA への逆転写反応は、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio, Siga, Japan) を用いて行った。

6. 定量的 RT-PCR

定量的 RT-PCR は以下のプライマーを使用し、LightCycler 480 system (Roche Applied Science, IN) を用いて行った。反応液との活性化を 95°C 2 分間施行後、45 サイクル (1 サイクル; 熱変性: 95°C 15 秒間、アニーリング・伸長反応: 60°C 1 分間)

の PCR を行い、cDNA を増幅して解析した。RT-PCR に使用したプライマーを表 1 に示した。標的遺伝子の発現値は RNA polymerase II (RP II) で標準化した。

7. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

肝癌細胞株培養上清中の chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) 濃度は ELISA assay kit (R&D, Minneapolis, MN)を用いて測定した。

8. 細胞増殖能の解析

細胞増殖能は MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole] assay を用いて評価した。MTT 試薬 (Roche, Basel, Switzerland) を使用し添付文書通りに測定した。Li7 あるいは Huh7 細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^3 個/ウェル播き、5 % CO₂、37℃の加湿環境下で 24・72・120 時間培養した。VersaMax (Molecular Devices, CA, USA) を用いて、生細胞数を反映する可溶化したホルマザン色素の吸光度 (575 nm) を測定し、増殖能として評価した。

9. 細胞移動能の解析

細胞移動能は two-chamber assay と Scratch Wound Healing Assay によって解析した。

Two-chamber assay:

24-well plate と 8 μm の pore size の Cell culture Insert (Corning Life Science, Pittsburgh, PA)を用いて行った。HOTAIR 過剰発現の検討ではインサート内に 1.0×10^5 個の Li7 細胞浮遊液を、HOTAIR ノックダウンの検討ではインサート内に 2.5×10^4 個の Huh7 細胞浮遊液を播き、5% CO_2 , 37°Cの加湿環境下でそれぞれ 54 および 72 時間培養した。インサート内の培養液中の FBS 濃度を 0%とし、インサート外側の培養液中の FBS 濃度を 10%として培養した。培養後にインサート内側の細胞を除去、洗浄し、Diff-Quik 染色液 (sysmex, Kobe, Japan) を用いて染色した。その後、インサートのメンブレンを切り出し、プレパラートに封入した。メンブレン外側に遊走した細胞数を、Image J によって画像認識することで計測し、相対値で示した。

Scratch Wound Healing Assay:

各細胞を 24-well plate に播き、コンフルエントの状態を確認したのち、200 μl ピペットチップで直線状に引っかき、培養細胞を剥離した。その後、5% CO_2 , 37°Cの加湿環境下で 24 時間培養し、顕微鏡下で剥離した間隙への遊走細胞の占有面積を計測した。

10.免疫不全マウス皮下における腫瘍増殖能の検討

動物実験は、宮城県立がんセンター動物実験施設管理委員会の承認を受け(MCC-AE-2016-7)、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」を遵守して行った。

免疫不全マウスである NOD/Shi-scid-IL2R γ null (NOG) マウス（実験動物中央研究所、神奈川）のメス 6 週齢を使用した。飼育室への搬入後 1 週間を環境適応期間として飼育した後に実験に使用した。Li7-HOTAIR とコントロール (Empty) のそれぞれの細胞を 1×10^5 個を 50 μ l の PBS に懸濁させ、50 μ l のマトリゲルと混和した後、マウスの背部に皮下注射を行って移植した。移植後のマウスは 7 週後まで週に 1 回腫瘍径を測定した。腫瘍体積(V) は Ovejera らの方法²⁹⁾に従い、 $V \text{ (mm}^3\text{)} = [\text{長径}] \times [\text{短径}]^2 \times 1/2$ の近似式として算出した。

11.HOTAIR の強制発現による発現遺伝子の網羅的解析

HOTAIR 強制発現 Li7 細胞とコントロール株における遺伝子発現をマイクロアレイ(Agilent 8 \times 60K)で網羅的に解析し、HOTAIR 強制発現 Li7 細胞とコントロール株間での HOTAIR に関連して変動する遺伝子を抽出した。遺伝子発現量は底を 2 として対数変換し、WAD 法³⁰⁾を用いて変動遺伝子の順位付けを行った。これらの計算には R 言語を使用した。なお、今回の検討では、HOTAIR の発現がコントロール株と比較し、より高値だった HOTAIR 強制発現 Li7 細胞株を用いた。

12. 末梢血単核細胞の分離

末梢血単核球(PBMCs)は、健常人のヘパリン化血液から Lymphoprep (AXIX-SHIELD, Oslo, Norway)を用いた密度勾配遠心沈殿法によって分離、回収した。

13. フローサイトメーターを用いた解析

BD FACS canto II (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey) を使用し、フローサイトメーターを用いた解析を行った。抗体は APC-CD14 (clone: HCD14)、FITC-CD68 (clone: Y1/82A)、Pacific Blue-HLA-DR (clone: L243)、PE-CD33(clone: P67.6)、APC/Cy7-CD11b (clone: ICRF44)を用いた。これら抗体はすべて BioLegend (San Diego, CA)より購入した。本検討では CD14⁺CD68⁺HLA-DR⁺を示す分画をマクロファージ、HLA-DR^{low/-}CD11b⁺CD14⁺CD33⁺を示す分画を MDSC と定義した。データは FlowJo Software (Tree Star, Ashland, Ohio)を用いて解析した。ゲートは未染色サンプルを基に設定した。

14. 共培養

肝細胞株から放出される液性因子を解析するため、0.4 μm pore サイズの cell culture insert (Corning Life Science, Pittsburgh, PA)を用いた two-chamber 法にて共培養を行った。24 ウェルプレートの下層に HOTAIR を強制発現させた Li7、Hep3B、siRNA によって発現抑制した Huh7 およびそれぞれのコントロール細胞を 1.0×10^5

cells/well、Cell Culture Insert（上層）には PBMC を 1.0×10^6 cells/well を播種し、共培養を行った。培地には、無血清培地 HepatoZYME -SFM (Gibco) を上層・下層いずれも 500 μ l ずつ用いた。5% CO₂ 存在下で 37°C の湿式インキュベーターで維持し、72 時間の共培養後、PBMC を回収し、上述のようにフローサイトメーターを用いて PBMC 中の免疫細胞の割合を解析した。

15. ヒト肝癌組織における HOTAIR と CCL2 発現の関連

肝癌組織は宮城県立がんセンター組織バンクに登録された手術検体 13 例（表 2）を用いた。HOTAIR と CCL2 の発現は上述の方法通り RT-PCR にて解析した。さらに、Gene Expression Omnibus から得られたデータベース（GSE2109）を用いて HOTAIR と CCL2 の発現と臨床 stage との関連を検討した。

16. 統計学的解析

統計学的解析は JMP ソフトウェア（SAS Institute, Cary, NC）を用いて行った。全てのデータは平均値 \pm 標準偏差で表した。検定には Student の t 検定を用いた。 P 値が 0.05 未満のものを統計学的に有意とした。臨床検体を用いた解析には Pearson のカイ二乗検定を用いた。

VI. 結果

1. HOTAIR 安定過剰発現株の樹立

4 種類の肝がん細胞株 Huh7, HepG2, Li7, Hep3B における HOTAIR の発現量を定量的 RT-PCR で測定した (図 1 A)。HOTAIR の発現は強弱の差はみられるものの検討した 4 株すべてにおいて認められた。HOTAIR の発現が相対的に低い Li7, Hep3B にレトロウイルスを用いて HOTAIR を遺伝子導入し安定発現細胞を樹立した (Li7-HOTAIR, Hep3B-HOTAIR)。Li7-HOTAIR、Hep3B-HOTAIR における HOTAIR の発現量はコントロール細胞(Empty)に比べそれぞれ 128 倍、89 倍に上昇していた (図 1B)。さらに、最も発現の高かった Huh7 に HOTAIR の siRNA (siHOTAIR) を遺伝子導入し、発現抑制細胞を作製した。上述の 3 種類の siRNA の効果を比較すると siHOTAIR3 が最も強く内因性の HOTAIR の発現を抑制したため、以下の実験は siHOTAIR3 を使用して行った。図 1C は代表的な siRNA 導入後 24 時間後の結果を示したものであり、内因性 HOTAIR 発現を 80%以上抑制した。

2. HOTAIR の肝癌細胞増殖能への影響

HOTAIR 過剰発現 Li7 細胞を用いて MTT assay を行い、empty vector を導入したコントロール細胞と比較した。その結果図 2A に示すように、増殖能に有意差を認めなかった。

3. HOTAIR の肝癌細胞移動能への関与

Wound healing scratch assay と Two-chamber assay の 2 つの方法を用いて細胞移動能を評価した。その結果、HOTAIR の過剰発現および発現抑制肝癌細胞ともに、それぞれのコントロール細胞と比べて移動能に有意差がみられなかった (図 2B, C)。

4. HOTAIR の免疫不全マウス皮下腫瘍形成能への関与

次に、腫瘍形成能を調べるために免疫不全マウスに HOTAIR 過剰発現 Li7 を皮下移植し、7 週間腫瘍径を測定した。図 2D に示すように HOTAIR 発現肝癌細胞とコントロール細胞を比較して腫瘍形成能に有意差を認めなかった。

5. HOTAIR 発現抑制による細胞増殖能・移動能への影響

siRNA を導入し HOTAIR の発現を抑制した Huh7 を用いて、上述の強制発現系と同様に細胞増殖能と移動能を検討した。その結果、コントロール細胞 (siControl) と HOTAIR ノックダウン Huh7 細胞 (siHOTAIR) の細胞増殖能 (図 3A)、移動能 (図 3B, C) に有意な差は認められなかった。

6. 肝癌細胞における HOTAIR 標的遺伝子の同定

過去の報告と異なり、私の解析では HOTAIR は肝癌細胞において増殖能、移動能、免疫不全マウスの皮下腫瘍形成能に影響を与えなかった。そこで、肝癌における

HOTAIR の標的遺伝子を同定することによって、HOTAIR が肝癌細胞の悪性化機構にどのように関与しているか推測することを試みた。HOTAIR 過剰発現細胞とコントロール細胞の発現プロファイルをマイクロアレイを用いて網羅的に比較した結果、HOTAIR 自身を除いて、CCL2 の発現が最も亢進していた(図 4A)。マイクロアレイの結果を RT-PCR にて検証した結果、Li7 並びに Hep3B とともに HOTAIR によって CCL2 の発現が亢進していることが確認された (図 4B)。また、CCL2 は分泌蛋白であることから、ELISA を用い検討すると、HOTAIR 発現細胞株でコントロール細胞に比べ有意に CCL2 の培養液中濃度が上昇していた(図 4C)。以上より、肝癌における HOTAIR の標的遺伝子の一つとして CCL2 が同定された。癌細胞で発現する CCL2 が TAM や MDSC をその近傍に誘導することが報告されていることから^{19, 20, 24}、私は HOTAIR が肝癌細胞の腫瘍免疫に何らかの役割を担っていると推測し、HOTAIR が免疫細胞に与える影響の検証を行った。一方、Huh7 は HOTAIR の発現が充分あるにもかかわらず、CCL2 の発現が認められなかった(図 4D)。

7. HOTAIR が免疫細胞に与える影響

1) HOTAIR の肝癌細胞における TAM 誘導能力の検証

HOTAIR の TAM 誘導能力を検討するために、HOTAIR 発現肝癌細胞と正常人の PBMC を 72 時間共培養し、PBMC 中の CD14⁺CD68⁺HLA-DR^{high}PBMC (マクロファージ) 分画の変化をフローサイトメーターで解析した。図 5A に代表的なフローサ

イトメーターを用いた解析を示した。その結果、Li7 と Hep3B とともに HOTAIR 発現細胞においてコントロール細胞に比べ、PBMC 中のマクロファージ分画に属する細胞数が有意に増加していた（図 5B）。HOTAIR によって誘導される PBMC 中のマクロファージの動員がその標的分子の CCL2 を介するものかを確認するために、CCL2 発現のない肝癌細胞 Huh7 において HOTAIR の発現を siRNA で抑制し同様の解析を行った。その結果、HOTAIR の発現を低下させても共培養した PBMC 中のマクロファージ分画に含まれる細胞数は減少しなかった(図 6A, B)。これらの結果は肝癌細胞において HOTAIR が CCL2 を介して TAM を誘導する能力を持つ可能性を示唆した。

2) HOTAIR の肝癌細胞における MDSC 誘導能力の検証

HOTAIR の MDSC 誘導能力を検討するために、HOTAIR 発現肝癌細胞と健常人の PBMC を 72 時間共培養し、PBMC 中の HLA-DR^{low}・CD11b⁺CD14⁺ PBMC (MDSC) 分画の変化をフローサイトメーターで解析した。Li7 と Hep3B とともに HOTAIR 発現細胞においてコントロール細胞に比べ有意に MDSC 分画に含まれる細胞数が増加していた(図 7A, B)。siRNA を導入し HOTAIR の発現を抑制した CCL2 発現のない Huh7 を用い、同様の実験を行った。HOTAIR の発現低下によって共培養した PBMC 中の MDSC 分画に含まれる細胞数に有意な変化は確認されなかった（図 8A, B）。従って、HOTAIR 過剰発現肝癌細胞株による PBMC 中の MDSC 分画に属する細胞数

の増加に CCL2 が不可欠であることが推定された。

8. ヒト肝癌組織における HOTAIR と CCL2 発現の関連

実際のヒト肝癌組織でも細胞株と同様のことが起こっているのかを、肝細胞癌の手術検体を用いて検討した。Stage II までの手術検体 13 例中、HOTAIR と CCL2 の発現がともにそれぞれの中央値以上に確認された例を 2 例 (15.4%) に認めた(図 9)。

さらに多数の症例を解析すべく、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 上で利用できるデータを利用して解析を行った。その結果、HOTAIR と CCL2 が共に発現亢進している例は stage I,II に比べ stage III, IV に多く存在している傾向がみられた(図 10A, B. $P=0.08$)。

VII. 考察

Linc RNA である HOTAIR は、肝細胞癌をはじめ、非小細胞肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌などを含む様々な癌腫においてその転移や予後不良と関連していることが報告されている⁷⁻¹⁴⁾。肝細胞癌においては HOTAIR の発現が再発期間や生命予後の短縮と有意に関連し、HOTAIR 発現を抑制した肝癌細胞は化学療法に対する感受性が上昇し移動能が低下することが示されている⁷⁾。また、HOTAIR の下流に癌遺伝子である Bmi-1 が存在し肝細胞の癌化を促進していることが示唆されている⁸⁾。しかし、他の癌種同様に未だ、HOTAIR の癌悪性化の分子機序については不明な点が多い。

本研究では、最初に樹立した HOTAIR 過剰発現肝細胞癌株を用いて機能解析を行った。HOTAIR が肝細胞癌を含む様々な癌において細胞増殖能や移動能を亢進させて悪性化形質の獲得に寄与していることから、その検証を行った。しかし、私の樹立した HOTAIR 過剰発現肝細胞癌株では、細胞増殖能や移動能がコントロール細胞に比べ亢進している結果は得られなかった。また、siRNA によって HOTAIR の発現を抑制した肝癌細胞を用いても細胞増殖能や移動能に変化を認めなかった。さらに、HOTAIR の発現は免疫不全マウスの皮下腫瘍形成能にも影響を与えなかった。これらは以前の報告と一致しない結果であった。その理由として、用いた細胞株の違いや導入した HOTAIR の強度の差などが考えられる。本研究で用いた発現ベクターは非小細胞肺癌や胃癌に用いて、その増殖能や移動能、転移能に変化を与えることが確か

められている^{9,10)}ことから、導入した遺伝子が矛盾した結果の原因になったとは考えにくい。一方、本研究と同様な結果は Ishibashi らの報告にもみられ、肝癌細胞に HOTAIR を過剰発現させるとその細胞増殖は亢進する傾向を示すが、有意な差ではないことが示されている⁶⁾。以上より、HOTAIR が肝癌細胞の悪性度を増強する機序には、細胞の増殖能や移動能の亢進以外の機序も存在することが想定された。

そこで、次に、肝癌細胞における HOTAIR の標的遺伝子を同定し、その遺伝子の持つ機能から HOTAIR の肝癌細胞悪性度増強の機序が推測できるか検討を行った。

HOTAIR を強制発現させた Li7 とコントロール細胞における遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイにて解析した結果、CCL2 がその標的分子の第一候補として同定された。CCL2 は、Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) とも呼ばれるケモカインであり、組織障害部位や感染部位に、その受容体 CCR2 を発現する単球を誘引する³¹⁻³³⁾。肝臓では肝星細胞、肝細胞、Kupffer 細胞および胆管上皮に発現がみられる³⁴⁾。肝細胞癌、大腸癌、神経膠腫など様々な癌において発現亢進が認められ、その発現が TAM ならびに MDSC を癌細胞周囲に誘導することが報告されている^{19-21, 24)}。最近、CCL2 が高発現した肝細胞癌症例は術後生存期間が短いこと、CCL2/CCR2 シグナルをその阻害剤によって遮断すると、TAM の腫瘍周囲への動員が抑制され T 細胞による本来の抗腫瘍免疫反応が活性化されマウスの肝腫瘍の増殖が抑制されることが示され、HCC (Hepatocellular carcinoma) の治療として CCL2/CCR2 が治療ターゲットになりうることが報告されている³⁵⁾。以上より、私は、

肝癌細胞において HOTAIR が CCL2 の発現を誘導し、TAM や MDSC を癌細胞周囲に動員することで、癌細胞が生体免疫機構から逃避することが可能となり進展していくという仮説を想定した。本検討の結果、HOTAIR 発現細胞株と PBMC を共培養すると、PBMC 中のマクロファージ分画および MDSC 分画に属する細胞数が有意に増加することが確認された。また、元来 CCL2 の発現のない Huh7 で HOTAIR の発現を抑制して PBMC と共培養を行っても、マクロファージや MDSC 分画中の細胞数に変化はみられなかった。このことは、PBMC 中のマクロファージや MDSC の増加には CCL2 の存在が必須であることを意味している。本結果はあらゆる癌腫において HOTAIR が腫瘍免疫を制御していることを示した最初のものである。一方、Huh7 のように HOTAIR が発現していても CCL2 の発現がみられない肝細胞癌細胞株もあり、肝細胞癌細胞株に CCL2 発現の多様性があることが示唆され、上述の HOTAIR による免疫抑制システムが機能していない肝癌症例も存在していると考えられた。また、共培養する肝細胞株（Li7, Hep3B, Huh7）によって、検出される CD14⁺HLA-DR^{high}CD68⁺細胞および CD14⁺HLA-DR^{low}CD33⁺CD11b⁺細胞の割合はばらつきがある（それぞれ約 1-15% および約 0.2-4%）。このことから、CCL2 が PBMC に対してどの程度の誘導能をもつのかは本研究では不明であり、肝細胞株によって上清中における CCL2 以外のサイトカインが異なるために誘導能に差がある可能性も含めて、さらなる詳細な解析が必要である。

MDSC の増加には、CCL2 以外にも GM-CSF, IL-6 等複数のサイトカインが関与

することが知られており³⁶⁾、TAM の増加には、CSF1, VEGF 等が関与することが知られている³⁷⁾。私は、本実験で認められたマクロファージ/MDSC の増加が、CCL2 単独の作用によるものかどうかを検討するために、リコンビナント CCL2 (rCCL2) を用いて PBMC を刺激し、マクロファージ・MDSC の分画を調べた。その結果、rCCL2 単独の刺激ではマクロファージ・MDSC の増加は認められなかった（データ省略）。この結果から、本研究で認められるマクロファージ・MDSC 分画の増大は、HOTAIR によって CCL2 以外の因子も制御を受け、マクロファージ・MDSC 分画に影響を与えていることが考えられる。マイクロアレイの結果からは上記のマクロファージ・MDSC に影響するサイトカインの有意な変動は認められていないが、タンパクレベルでの網羅的なサイトカインの検討も必要だと考えられた。

CCL2 の発現制御機構には複数の報告が認められる。マウス線維芽細胞においては、CCL2 遺伝子の転写は LPS や TNF による刺激に応じて、NF- κ B ダイマーが CCL2 プロモーター遠位部に結合し活性化される³⁸⁾。転写因子 SP1 は、CCL2 遺伝子 5'-UTR の GC-box に結合し、転写を制御する³⁹⁾。最近の研究では、SP1 は miR-326 の標的遺伝子であり、HOTAIR は miR-326/SP1 経路を修飾することが知られている⁴⁰⁾。これらのことから、HOTAIR は転写因子 SP1 を介して CCL2 発現を制御する可能性が考えられるが、さらに詳細な解析が必要である。

ヒト肝細胞癌検体を用いて HOTAIR と CCL2 の発現を検討してみると、ともに高発現している例は stage の高い癌で、stage の低い癌にくらべ多い傾向にあることが

確かめられた。このことは、HOTAIR が CCL2 の発現を誘導することにより悪性化した可能性のある肝細胞癌例が多数存在することを示唆しており、上記の細胞株を用いた実験結果を強く支持するものであった。

VIII. 結論

本研究の結果、HOTAIR の肝細胞癌悪性化の分子機序のひとつとして、CCL2 を介した TAM および MDSC の誘導による肝癌細胞の生体免疫機構からの逃避の可能性が明らかになった。

IX. 謝辞

本研究においてご指導を賜りました東北大学大学院消化器病態学 下瀬川徹教授、宮城県立がんセンター研究所がん幹細胞研究部の佐藤賢一部長、玉井恵一上席主任研究員に深謝いたします。

X. 参考文献

1. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011; 365:1118–27.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61:69–90.
3. Chatterjee R, Mitra A. An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer. *Int Immunopharmacol*. 2015; 24: 335-45.
4. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007; 129: 1311-1323
5. Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010; 464: 1071-6.
6. Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, et al. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2013; 29: 946-50.
7. Yang Z, Zhou L, Wu LM, et al. Overexpression of long noncoding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18: 1243-1250
8. Fu WM, Zhu X, Wang WM, et al. Hotair mediates hepatocarcinogenesis

- through suppressing miRNA-218 expression and activating P14 and P16 signaling. *J Hepatol.* 2015; 63: 886-95.
9. Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, et al. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 436: 319-24
 10. Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, et al. Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer. *PLoS One.* 2013; 8: e77070.
 11. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res.* 2011; 71: 6320-6326.
 12. Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene.* 2012; 193: 1-10.
 13. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR Drive Malignant Character in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Res.* 2012; 72: 1126-1136.
 14. Xu ZY, Yu QM, Du YA, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR

- suppresses tumor invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Int J Biol Sci.* 2013; 9: 587-97
15. Lee M, Kim HJ, Kim SW, et al. The long non-coding RNA HOTAIR increases tumour growth and invasion in cervical cancer by targeting the Notch pathway. *Oncotarget.* 2016; 7: 44558-44571.
 16. Serghiou S, Kiyriakopoulou A, Ioannidis JP. Long noncoding RNAs as novel predictors of survival in human cancer: a systematic review and meta-analysis. *Mol Cancer.* 2016; 15: 50.
 17. Heubach J, Monsior J, Deenen R, et al. The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells. *Mol Cancer.* 2015; 14: 108.
 18. Iwata T, Kondo Y, Kimura O, et al. PD-L1+MDSCs are increased in HCC patients and induced by soluble factor in the tumor microenvironment. *Sci Rep.* 2016; 6:3 9296.
 19. Chang AL, Miska J, Wainwright DA, et al. CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 2016; 76: 5671-5682.
 20. Chun E, Lavoie S, Michaud M, et al. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population

- and Function. *Cell Rep.* 2015; 12: 244-57.
21. Lacotte S, Slits F, Orci LA, et al. Impact of myeloid-derived suppressor cell on Kupffer cells from mouse livers with hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology.* 2016; 5: e1234565.
 22. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci.* 2014; 105: 1-8.
 23. Shirabe K, Mano Y, Muto J, et al. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surgery today.* 2012; 42: 1-7.
 24. Izumi K, Fang LY, Mizokami A, et al. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med.* 2013; 5: 1383-1401.
 25. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, et al. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 2016; 37: 208-220.
 26. Keskinov AA, Shurin MR. Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. *Immunobiology.* 2015; 220: 236-242.
 27. Stewart TJ, Smyth MJ. Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30: 125-140.

28. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol.* 2003; 31: 1007–1014.
29. Ovejera AA, Houchens DP, Barker AD. Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* 1978; 8: 50-6.
30. Kadota K, Nakai Y, Shimizu K. A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. *Algorithms* *Mol Biol.* 2008 3:8
31. Bruserud O, Kittang AO. The chemokine system in experimental and clinical hematology. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 341: 3-12.
32. Li M, Ransohoff RM. The role of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009; 19: 111-115.
33. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res* 2011; 317: 575-589.
34. Sahin H, Trautwein C, Wasmuth HE. Functional role of chemokines in liver disease models. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 682-90.
35. Li X, Yao W, Yuan Y, et al. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2017; 66: 157-167.

36. Pyzer AR, Cole L, Rosenblatt J, et al. Myeloid-derived suppressor cells as effectors of immune suppression in cancer. *Int J Cancer*.2016; 139: 1915-1926
37. Noy R, Pollard JW. Tumor associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41: 49-61
38. Ping D, Boekhoudt GH, Rogers EM et al. Nuclear factor-kappa B p65 mediates the assembly and activation of the TNF-responsive element of the murine monocyte chemoattractant-1 gene. *J Immunol* 1999; 162: 727-734
39. Ueda A, Okuda K, Ohno S et al. Nf-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol*. 1994; 153: 2052-2063
40. Li J, Li S, Chen Z et al, miR-326 reverses chemoresistance in human lung adenocarcinoma cells by targeting specificity protein 1. *Tumour Biol*. 2016; 37: 13287-13294

XI. 図表説明

図 1 HOTAIR 過剰発現株と HOTAIR ノックダウン株の作成

A. 各肝癌細胞株 (Huh7, HepG2, Li7, Hep3B) の HOTAIR 発現を real time PCR で確認した。HOTAIR の発現値は Huh7 の発現値を 1 とした相対発現度で表した (n=3)。

B. HOTAIR 安定発現肝癌細胞株の樹立

HOTAIR 発現が相対的に低い Li7 と Hep3B にレトロウィルスを用いて HOTAIR の遺伝子導入を行った。HOTAIR の発現値は Huh7 の発現値を 1 とした相対発現度で表した。HOTAIR の cDNA を含まないベクターを導入したコントロール細胞より、Li7, Hep3B それぞれ 128 倍 (* $P=0.0004$, n=3)、89 倍 (* $P<0.0001$, n=3) に HOTAIR 発現が上昇していた。

C. siRNA による HOTAIR の発現抑制

HOTAIR 発現が相対的に高い Huh7 に siRNA を用いて HOTAIR の発現をノックダウンしたところ、コントロールと比較し、HOTAIR の発現は約 14%までに抑制された。HOTAIR の発現値は siControl の発現値を 1 とした相対発現度で表した (* $P=0.0002$, n=3)。

図 2 HOTAIR と細胞増殖、細胞移動能、腫瘍形成能の関連

A, HOTAIR 発現 Li7 とコントロール細胞の腫瘍増殖能を MTT assay にて比較検討した。1 日目の吸光度を 1 とした。細胞増殖に有意な差は認められなかった (n=5)。

B, HOTAIR 発現 Li7 の移動能を Scratch Wound Healing Assay にて、コントロール細胞と比較した結果、細胞間隙の面積に有意差を認めなかった (n=3)。右に代表的な結果を示す。Assay 開始時と 24 時間後の図であり、破線で挟まれた部分が細胞間隙を示している。N.S., 有意差なし。

C, Two Chamber assay にて細胞移動能を評価しても、コントロール細胞(Empty)と HOTAIR 発現 Li7 細胞 (HOTAIR) に有意差を認めなかった (n=3)。右に代表的な結果を示す。移動した細胞の Diff - Quik 染色像である。N.S., 有意差なし。

D, 腫瘍形成能を調べるために免疫不全マウスに HOTAIR 過剰発現 Li7 を皮下移植し、7 週間腫瘍径を測定した。HOTAIR 過剰発現細胞(○)とコントロール細胞(●)の腫瘍形成能に有意差を認めなかった (n=8)。

図 3 HOTAIR 発現抑制による細胞増殖能、移動能への影響

A, HOTAIR 発現抑制 Huh7 とコントロール細胞の腫瘍増殖能を MTT assay にて比較検討した。1 日目の吸光度を 1 とした。細胞増殖に有意差は認められなかった (n=5)。

B, HOTAIR 発現抑制 Huh7 の移動能を Scratch Wound Healing Assay にて、コントロール細胞と比較した結果、細胞間隙の面積に有意差を認めなかった (n=3)。右に代表的な結果を示す。Assay 開始時と 24 時間後の図であり、破線で挟まれた部分が細胞間隙を示している。

C, Two Chamber assay にて細胞移動能を評価しても、コントロール細胞 (ctrl) と

HOTAIR 発現抑制 Huh7 (siHOTAIR) に有意な差は認めなかった。右に代表的な結果を示す。移動した細胞の Diff-Quik 染色像である (n=3)。N.S., 有意差なし。

図 4 HOTAIR による CCL2 発現の誘導

A, HOTAIR 過剰発現株 (Li7) とコントロール株での発現遺伝子をマイクロアレイで網羅的に解析し、2 つの細胞株間での HOTAIR に関連して変動する遺伝子を解析した。HOTAIR 以外で発現が最も発現が亢進していた遺伝子として CCL2 を同定した (n=4)。

B, CCL2 の発現を real time PCR で検証したところ、HOTAIR 過剰発現 Li7 (* $P<0.0001$ 、n=4) および Hep3B (* $P<0.0001$ 、n=4) で CCL2 の発現がコントロール細胞に比べ有意に上昇していることが確認された。

C, CCL2 の発現を ELISA で確認したところ、HOTAIR 過剰発現 Li7 細胞培養液中で CCL2 濃度がコントロールに比べ有意に高値だった(* $P=0.0002$ 、n=5)。

D, 一方、本研究に用いた肝癌細胞株のうち最も内因性 HOTAIR の発現が高かった Huh7 において CCL2 の発現を検出できなかった (n=3)。

Empty : コントロール細胞、HOTAIR: HOTAIR 過剰発現細胞

図 5 HOTAIR による PBMC 中のマクロファージ分画の変化

A, 左 : HOTAIR 過剰発現 Li7 細胞と PBMC の共培養のシェーマを示す。右 : 代表

的なフローサイトメーターを用いた解析の結果を示す。

B, 左: HOTAIR 過剰発現 Li7 と PBMC の共培養結果を示す。HOTAIR 過剰発現 Li7

との共培養でマクロファージ分画が有意に増加していた(* $P=0.0032$, $n=5$)。

右: HOTAIR 過剰発現 Hep3B と PBMC の共培養 72 時間後のフローサイトメーター

を用いた解析を示す。HOTAIR 過剰発現 Hep3B との共培養でマクロファージ分画が

有意に増加していた(* $P=0.0007$, $n=4$)。

Empty: コントロール細胞、HOTAIR: HOTAIR 過剰発現細胞

図 6 CCL2 発現のない肝癌細胞における HOTAIR 発現抑制の PBMC 中マクロファージ分画の変化

A, 代表的なフローサイトメーターを用いた解析の結果を示す。

B, HOTAIR をノックダウンした Huh7 と PBMC を共培養した結果、マクロファージ分画に属する細胞数は変化しなかった ($n=3$)。

N.S., 有意差なし。

図 7. HOTAIR による PBMC 中の MDSC 分画の変化

A, 代表的なフローサイトメーターを用いた解析の結果を示す。

B, 左: HOTAIR 過剰発現 Li7 と PBMC の共培養 72 時間後のフローサイトメーター

を用いた解析を示す。HOTAIR 過剰発現 Li7 との共培養で MDSC 分画が有意に増加

していた(* $P=0.018$, $n=5$)。

右 : HOTAIR 過剰発現 Hep3B と PBMC の共培養結果を示す。HOTAIR 過剰発現 Hep3B との共培養で MDSC 分画が有意に増加していた。(* $P=0.0014$, $n=4$)。

図 8. CCL2 発現のない肝癌細胞 Huh7 における HOTAIR 発現抑制の PBMC 中 MDSC 分画の変化

A, 代表的なフローサイトメーターを用いた解析を示す。

B, HOTAIR をノックダウンした Huh7 と PBMC を共培養した結果、MDSC 分画に属する細胞数は変化しなかった ($n=3$)。

N.S., 有意差なし。

図 9. 臨床検体における HOTAIR と CCL2 の発現

A, stage I, II における症例ごとの HOTAIR と CCL2 の発現をグラフにまとめた。

mcc27 と mcc21 の 2 例 (*) が HOTAIR と CCL2 が同時に高発現していた。

図 10. The Cancer Genome Atlas を利用した肝癌症例における HOTAIR と CCL2 の発現

A, The Cancer Genome Atlas (TCGA) より肝癌症例の HOTAIR と CCL2 の発現を検索可能なデータから症例を抽出し、各症例のシグナル強度を散布図にまとめた。点

線で示した値を HOTAIR/CCL2 のカットオフ値として、次表を作成した。

B, A の散布図のデータを二元表にまとめた。HOTAIR と CCL2 を同時に発現している例は stage I, II の症例に比べ stage III, IV 症例に多い傾向が認められた。

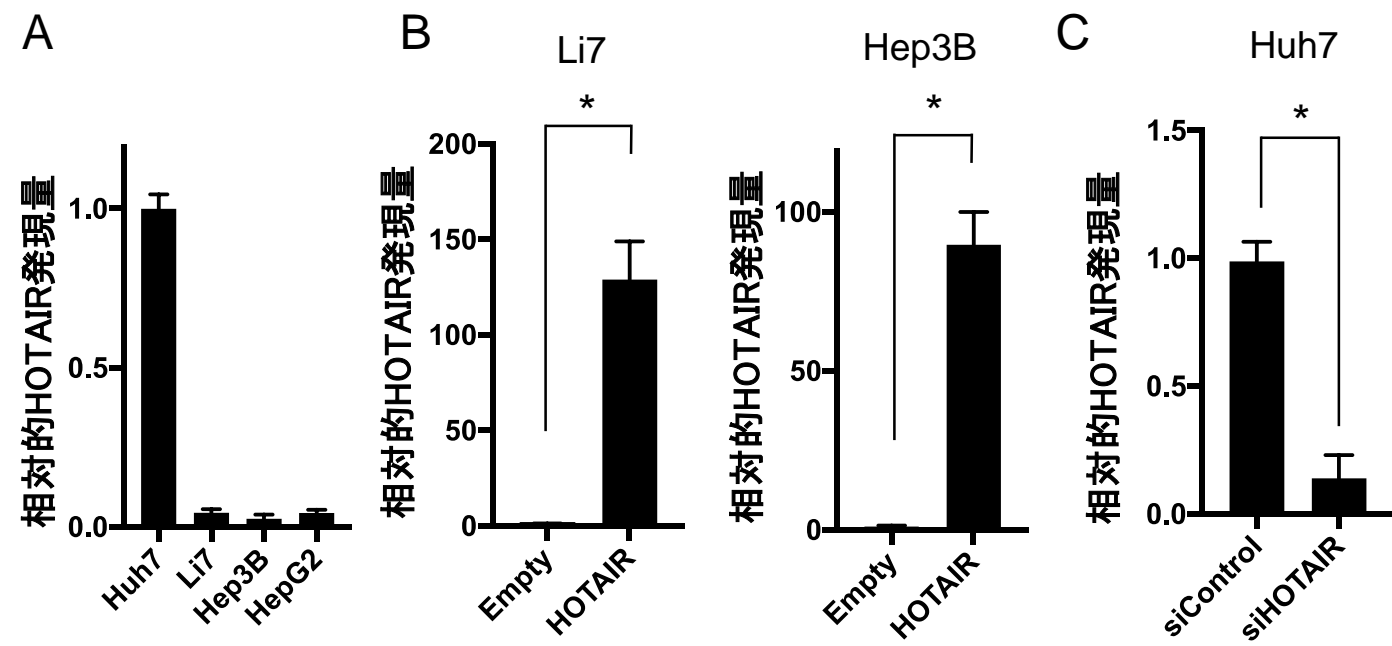


図2

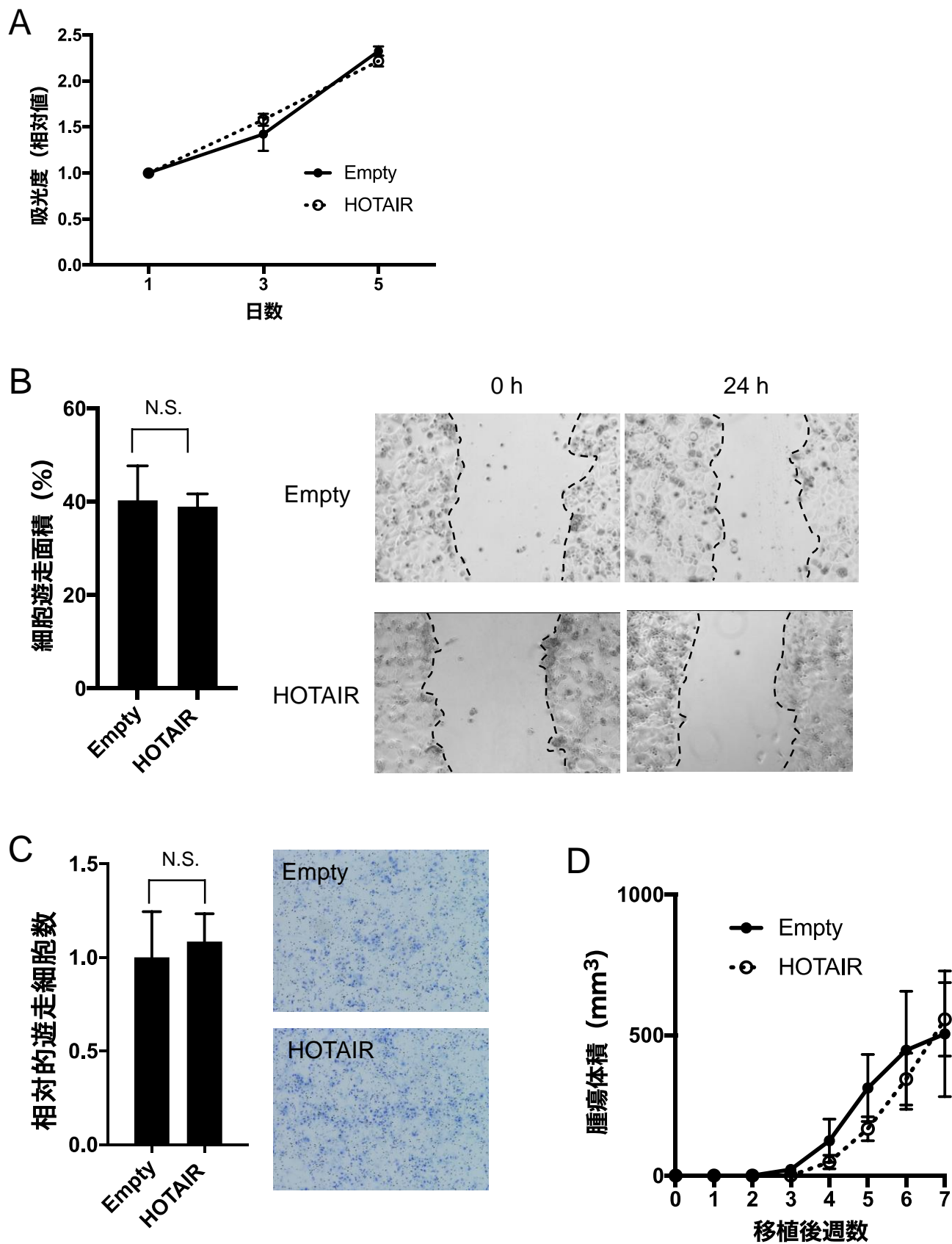
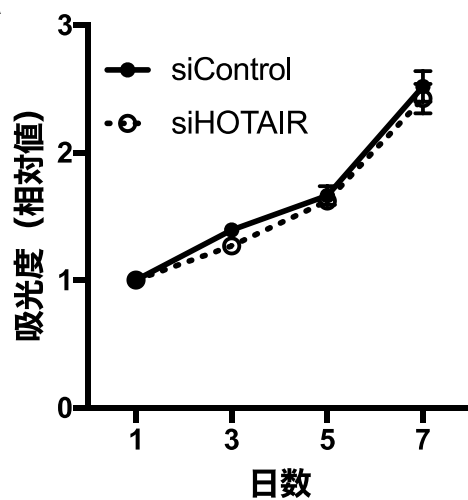
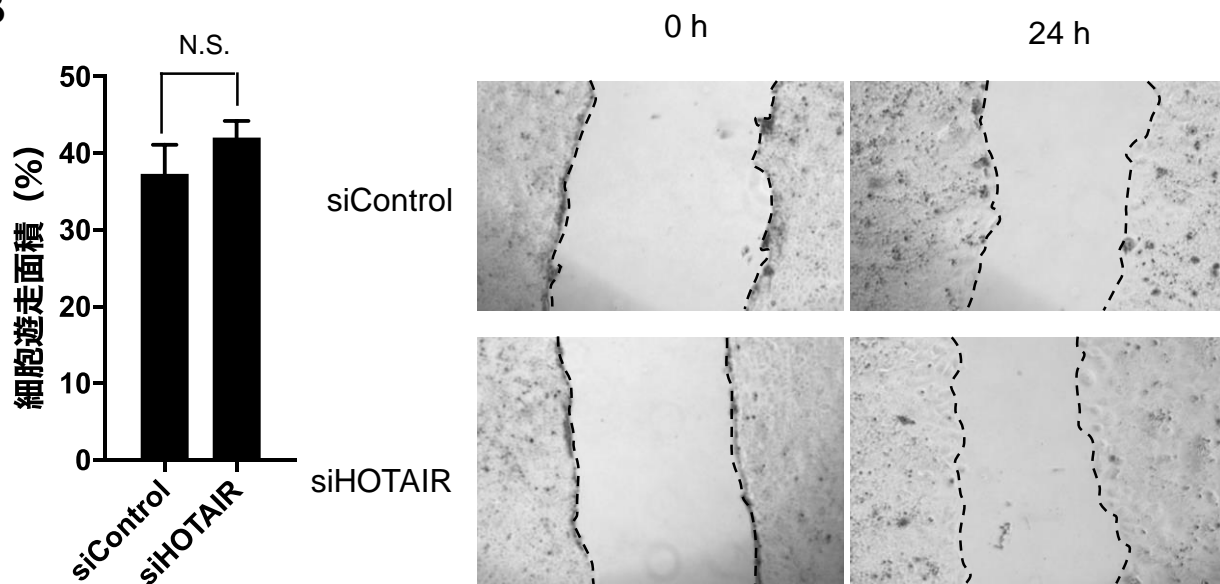


図3

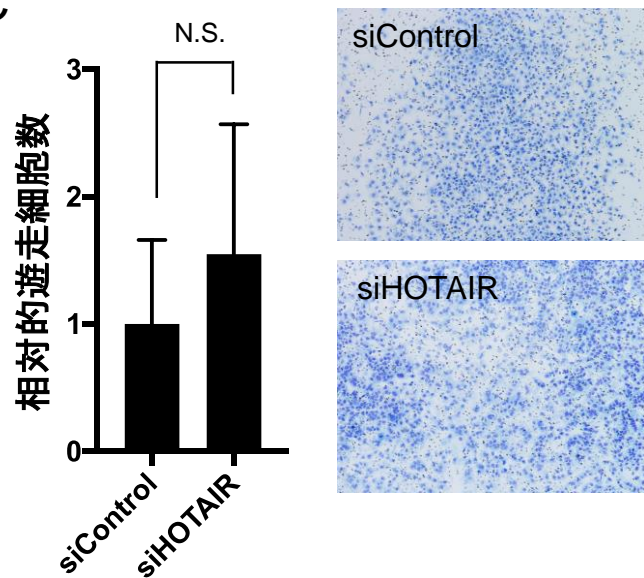
A



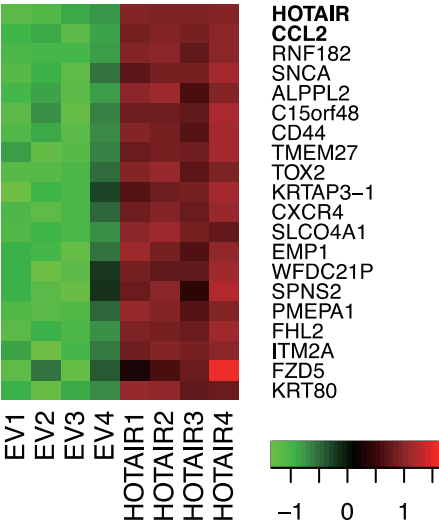
B



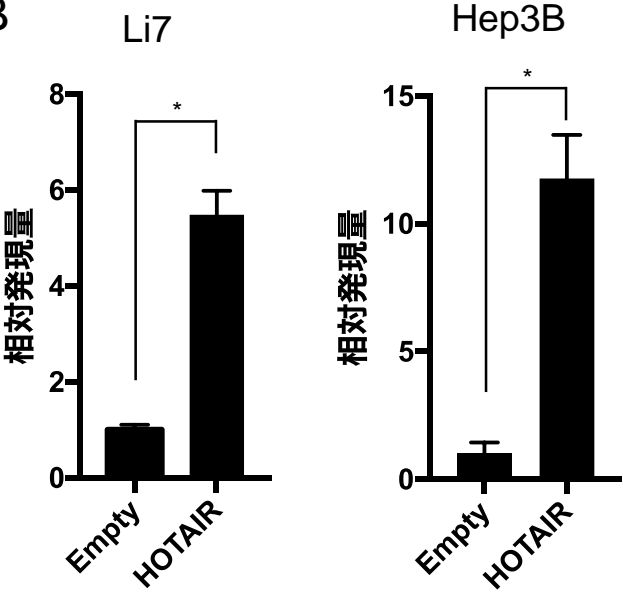
C



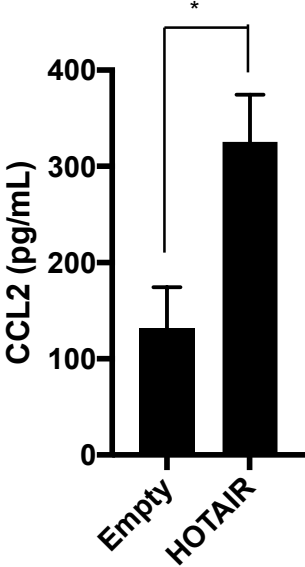
A



B



C



D

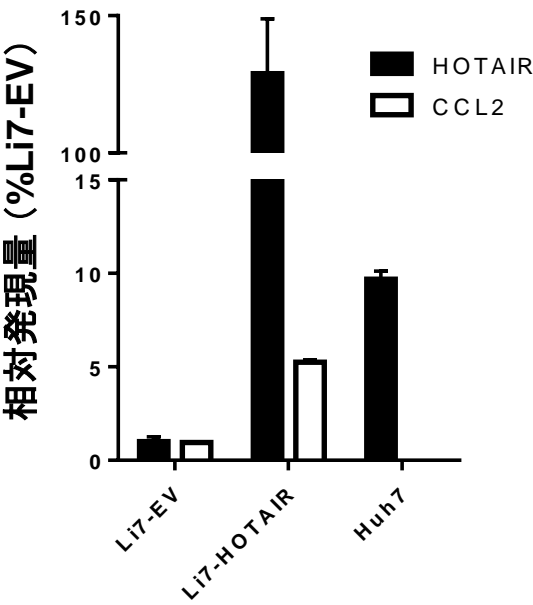
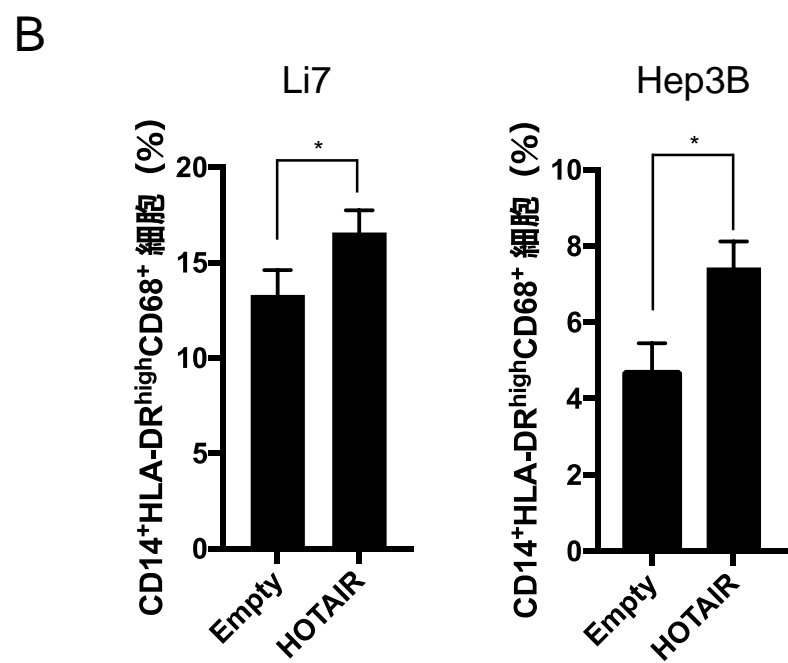
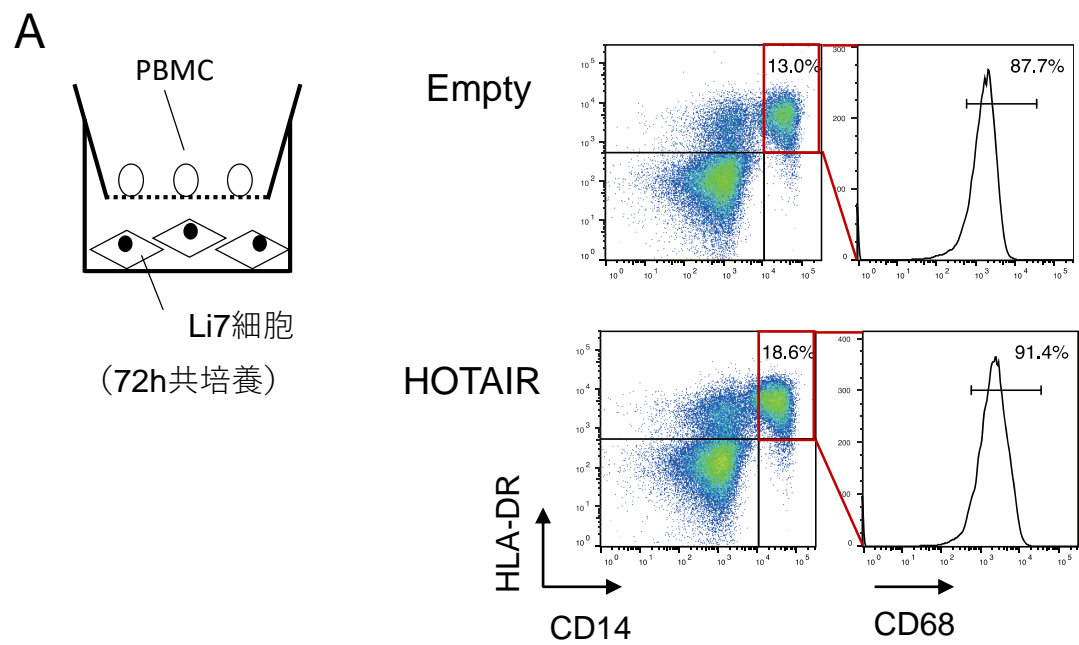
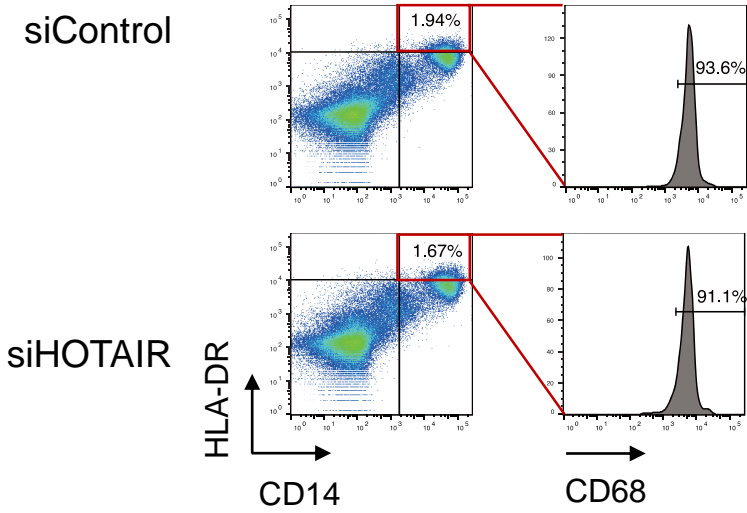


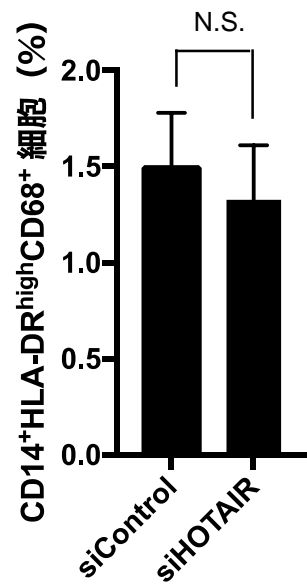
図5

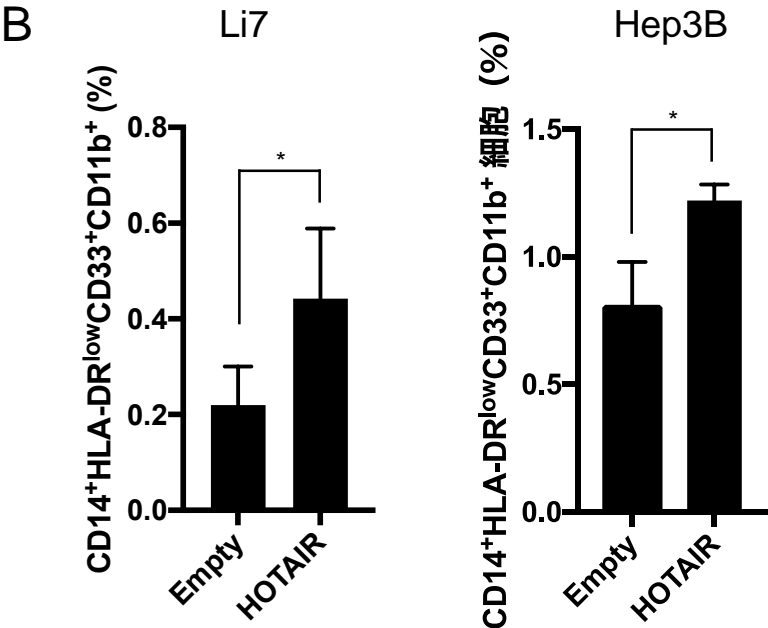
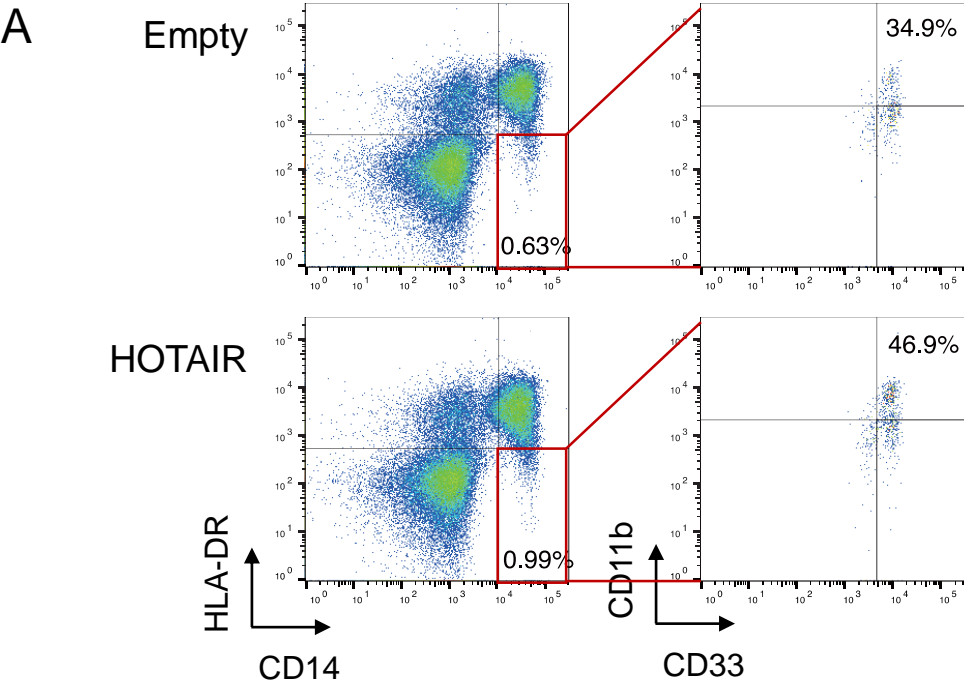


A

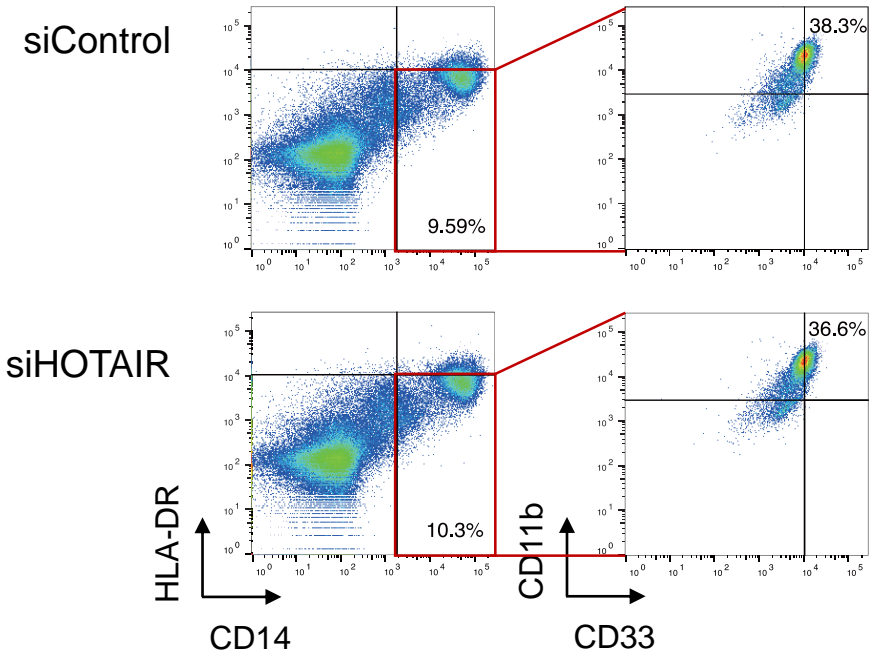


B

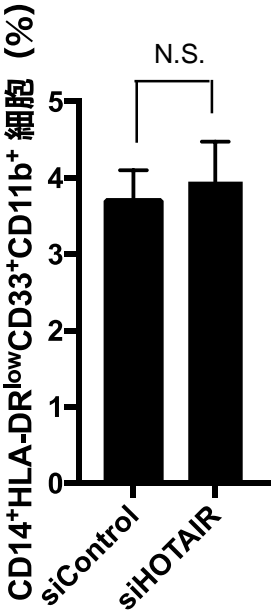


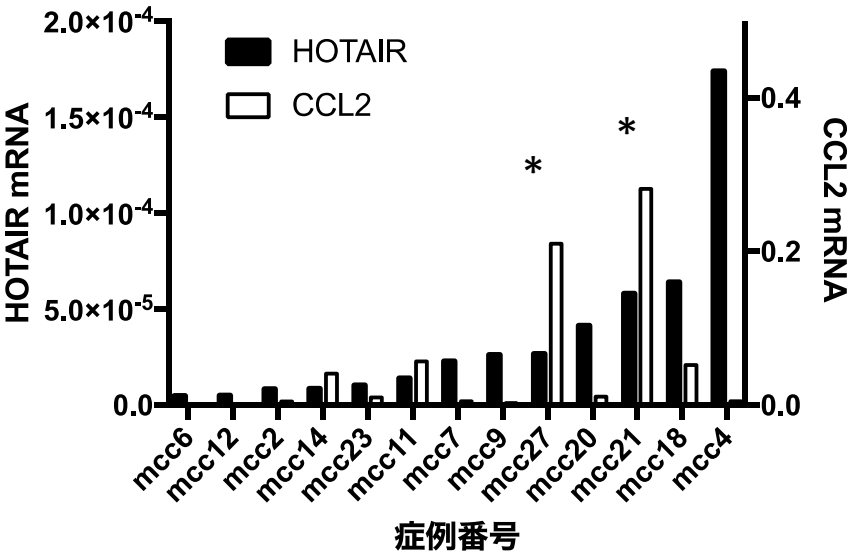


A

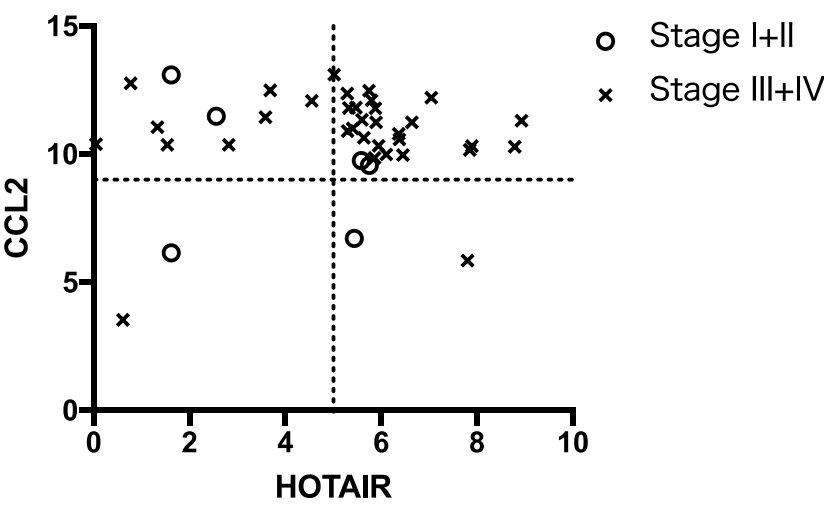


B





A



B

	HOTAIR/CCL2 同時高発現	
	-	+
Stage I + II	4	2
Stage III + IV	10	24

P=0.078 (Pearson’s chi-square test)

表1 PCRプライマー

遺伝子		プライマー配列
HOTAIR	forward	ggtagaaaaagcaaccacgaagc
	reverse	acataaacctctgtctgtgagtgcc
CCL2	forward	agtctctgccgcccttct
	reverse	gtgactggggcattgattg
RP II	forward	gcaccacgtccaatgacat
	reverse	gtgcggctgcttcataa

表2 臨床的背景

肝細胞癌患者 (13症例)		
年齡 (平均±標準偏差)		68.7±5.13
性別	男	10
	女	3
TNM (UICC7) 分類	I	8
	II	5